

METHOD FOR DETECTING MYCOPLASMA

Patent number: JP4004899
Publication date: 1992-01-09
Inventor: UEMORI TAKASHI; ASADA KIYOZOU; KATOU
FUMINOSHIN; HARASAWA AKIRA
Applicant: TAKARA SHUZO CO
Classification:
- international: C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-
7): C12Q1/68
- european:
Application number: JP19900106354 19900424
Priority number(s): JP19900106354 19900424

Report a data error here

Abstract of JP4004899

PURPOSE: To quickly and simply detect mycoplasma in a sample in high sensitivity by detecting DNA sequence coding gammaRNA of mycoplasma. **CONSTITUTION:** Detection of mycoplasma is carried out by detecting DNA sequence coding gammaRNA of mycoplasma or detecting DNA sequence specific to mycoplasma of part thereof. Furthermore, detection of DNA sequence is carried out by PCR method using gene amplifying kit and automatic gene amplifying device containing an oligonucleotide primer and tack polymerizer for amplifying the above-mentioned DNA sequence.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

D6

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-4899

⑤ Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成4年(1992)1月9日

C 12 Q 1/68
C 12 N 15/11

ZNA A

6807-4B

8717-4B C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全13頁)

⑬ 発明の名称 マイコプラズマの検出方法

⑯ 特 願 平2-106354

⑰ 出 願 平2(1990)4月24日

⑱ 発 明 者 上 森 隆 司 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

⑱ 発 明 者 浅 田 起 代 蔵 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

⑱ 発 明 者 加 藤 郁 之 進 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

⑱ 発 明 者 原 澤 亮 東京都足立区六月3-9-12

⑲ 出 願 人 寶 酒 造 株 式 会 社 京都府京都市伏見区竹中町609番地

⑳ 代 理 人 弁 理 士 中 本 宏 外2名

最終頁に続く

明 細 書

〔従来の技術〕

1. 発明の名称

マイコプラズマの検出方法

2. 特許請求の範囲

1. マイコプラズマの検出方法において、マイコプラズマのrRNAをコードしているDNA配列、又はその一部のマイコプラズマに特異的なDNA配列を検出することを特徴とするマイコプラズマの検出方法。

2. 請求項1記載の方法を用いて検出を行うための検出キットであって、マイコプラズマの特異的なDNA領域を増幅させるための特定のプライマーを含有していることを特徴とするマイコプラズマ検出キット。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、マイコプラズマの検出方法に関し、更に詳細には該マイコプラズマの特異的なDNA領域の検出に関する。本発明はまた、このような検出のための検出キットに関する。

19世紀末にウシの呼吸器病の病原体として発見されたマイコプラズマは広く動物界、植物界で生息し、その一部は宿主の疾病の原因となっている。例えば、ヒトの原発性異型肺炎、ニワトリの呼吸器マイコプラズマ症、ブタのマイコプラズマ肺炎などがあり、その診断、治療、予防などの研究が活発に行われている。また、組織培養中のマイコプラズマ汚染も発見され、汚染マイコプラズマの検出方法並びに除去方法などの研究も進行している。更に、実験動物は医学・生物学の研究の上で果す重要性が近年高まり、その品質についても高度なものが要求されてきており、マウス、ラット等の実験動物のコロニーを維持、管理する上でもマイコプラズマ汚染の診断と予防は重要な項目となってきている。

マイコプラズマの検出方法としては、分離培養方法、DNA蛍光染色方法、生化学的方法、免疫学的方法などが開発されている。

〔発明が解決しようとする課題〕

上記各方法は、マイコプラズマの検出方法として、通常利用されているが、その操作は煩雑であり、簡便な方法ではない。一方、近年種々の遺伝子診断方法が開発されてきた。マイコプラズマの特徴はその遺伝子により規定されている。このマイコプラズマに特徴的な遺伝子配列を高感度かつ迅速に検出できればマイコプラズマの存在を簡便に、確定することができ、家畜、実験動物、組織培養等の管理が容易となる。

すなわち、本発明の目的はマイコプラズマ一般に共通な遺伝子配列を明らかにし、その検出方法及びそれに用いるキットを提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、マイコプラズマの検出方法に関し、マイコプラズマのrRNAをコードしているDNA配列、又はその一部のマイコプラズマに特異的なDNA配列を検出することを特徴とし、また第2の

発明は、上記第1の発明の方法を用いて検出を行うためのマイコプラズマ検出キットに関し、マイコプラズマの特異なDNA領域を増幅させるための特定のプライマーを含有していることを特徴とする。

マイコプラズマのrRNAをコードするDNAは、16SrRNA-スベーター領域-23SrRNA-スベーター領域-5SrRNAの各DNA配列で構成されている。本発明者らは前記課題を解決するために11種のマイコプラズマのrRNAをコードしているDNA配列の一部、すなわち16SrRNA-スベーター領域-23SrRNAをコードしているDNA配列の一部を明らかにし、次にマイコプラズマ一般に共通なDNA配列を見出した。

次に、遺伝子検出方法として現在最も高感度で簡便なPCR (Polymerase Chain Reaction) 法〔サイキ (Saiki) ら、サイエンス (Science)、第230巻、第1350~1354頁、(1985)〕を行うために、マイコプラズマに共通なDNA

配列の特定領域DNAをPCR法で増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。また増幅されたマイコプラズマDNAを検出するためのプローブも合成した。次に各マイコプラズマDNAを鋳型としてPCR法を行い、すべてのマイコプラズマDNAの特定領域が効率よく増幅、検出されることを見出した。

以下順を追って本発明を具体的に説明する。

マイコプラズマの検出に用いられるrRNAをコードするDNA配列としては、マイコプラズマに共通な配列であれば良いが、例えば16SrRNA-スベーター領域-23SrRNAをコードするDNA配列より共通配列を見出せば良い。マイコプラズマの16SrRNA-スベーター領域-23SrRNAをコードしているDNA配列は次のように決定される。

例えば、培養細胞汚染マイコプラズマの中で高い割合を占めるマイコプラズマ フェーメントス (*Mycoplasma fermentans*) PG18株、マイコプラズマ ハイオリニス (*M. hyorhinis*)

BTS7株、マイコプラズマ オーラレ (*M. orale*) CH19299株、マイコプラズマ ホミニス (*M. hominis*) PG21株、マイコプラズマ サリバリウム (*M. salivalium*) PG20株、マイコプラズマ アルギニニ (*M. arginini*) G230株、ウレアプラズマ ウレアリティカム (*Ureaplasma urealyticum*) T960株、マウス、ラットの病原性マイコプラズマである、マイコプラズマ ブルモニス (*M. pulmonis*) m53株、マイコプラズマ アルスリティディス (*M. arthritidis*) PG6株、マイコプラズマ ニューロリティカム (*M. neurolyticum*) PG28株、ブタの病原性マイコプラズマである、マイコプラズマ ハイオニューモニエ (*M. hyopneumoniae*) VPP11株、ヤギの病原性マイコプラズマである、マイコプラズマ カブリコラム (*M. capricolum*) CALIP、KID株をそれぞれ培養し、次にDNAを調製する。一方、マイコプラズマ カブリコラムの16SrRNA-スベーター領域-23SrRNAをコードするDNA配列〔モレキュラー アン

ド ジェネラル ジェネティックス (Molecular and General Genetics) 第 196 巻、第 317 ~ 322 頁 (1984) の本明細書の添付図面の第 1 図に示す DNA 配列より、この領域及び他のマイコプラズマ DNA も PCR 法で増幅できる一対のプライマー対、例えば下記表 1 のプライマー対を選定する。

なお、第 1 図は、マイコプラズマ カプリコラムの 1922bp の塩基配列を示す図である。

表 1

| | |
|----------------------------|-----------|
| 5' GTAATCGCGAATCAGCTATG 3' | プライマー 1-1 |
| 5' CACTTATCGCAGGTAGTCAC 3' | プライマー 1-2 |

このプライマー対は DNA 合成機により合成でき、HPLC にて精製できる。このプライマー対を用い、マイコプラズマ カプリコラム以外の上記 11 種の DNA を鋳型として PCR 反応を行い、DNA 配列決定用の DNA の増幅を行う。

PCR 法についてはタッカーポリメラーゼ (Taq-polymerase) を含む遺伝子増幅キット及び

自動遺伝子増幅装置が宝酒造社から市販されており、これと前述のプライマー対を用い、マイコプラズマ DNA の増幅反応を行う。

PCR 法としては、酵素として、例えば耐熱性タッカーポリメラーゼを用い、DNA の変性 (95℃) の工程、プライマー DNA のアニーリング (37℃) の工程、DNA 相補鎖の酵素的合成 (72℃) の工程より成る温度サイクルを 50 回繰返し、目的遺伝子を増幅する。この場合アニーリング温度、温度サイクル回数は、鋳型 DNA とプライマー DNA の T_m 鋳型、プライマー間の相同性を考慮して適宜選定される。

次に増幅された DNA の塩基配列を決定する。

PCR 法によって増幅された DNA の塩基配列決定は、一旦 DNA を M13 又は pUC 等のファージ又はプラスミドベクターにクローニングする方法、又はこのクローニングのステップを省略し、直接 PCR 増幅 DNA を用いる方法 [ダイレクト シークエンス (Direct Sequence) 法] で決定することができる。タッカーポリメ

ラーゼを用いたイン ビトロ (in vitro) DNA 合成の際に起こりうるミスインコーポレーションに起因する DNA 配列の読み間違いを防ぐためにも、また時間、費用を節約するためにも、ダイレクト シークエンス法が有利である。

ダイレクト シークエンス法において、従来は PCR 増幅の際に 2 つのプライマー比を 1 : 100 程度にしておいて、片側の DNA 鎖を、もう一方の DNA 鎖より過剰に生じさせ (非対称 PCR (Asymmetric PCR))、得られた一本鎖 DNA を鋳型に用いて行うのが主流であった。しかし、この方法では、用いるプライマーによってプライミング効率が大きく異なるため、一本鎖 DNA をシークエンス反応用に十分量得るために、あらかじめ実験を行ってプライマーの濃度比を決めておく必要があった。今回のように多くのサンプルの塩基配列を決める必要がある場合は、これは実際的ではない。本発明者らは、一本鎖 DNA を生じさせないで、二本鎖 DNA をそのまま用いて塩基配列を決定する方

法を検討した。その結果、塩基配列決定用プライマーを鎖状の鋳型 DNA にアニールさせる場合において、鋳型 DNA を熱変性させた後、従来専ら用いられてきたように徐冷するのではなく急冷することによってプライマーと鋳型との会合が、鋳型同士の間より、より優先して起こることを見出し、この急冷方法を適用することにより、二本鎖で鎖状の PCR 増幅 DNA を鋳型として用いた場合でも容易にジオキシ法によりマイコプラズマの塩基配列を決定することができた。また、この方法を用いる場合、ラジオアイソトープ等で末端を標識したプライマーを用いれば、読み取り可能なシークエンスラダーを得るために必要な鋳型 DNA の精製法としては、PEG を用いた分別沈殿法で PCR 増幅産物からプライマーを除くという簡便な操作で十分である。

その各マイコプラズマの 16S rRNA スベーター領域 - 23S rRNA をコードする DNA 配列は、第 2 図 ~ 第 15 図に示すとおりで

ある。すなわち、第2図はマイコプラズマ　ハイオリニス（480 bp）の、第3図はマイコプラズマ　オーラレ（460 bp）の、第4図はマイコプラズマ　サリバリウム（438 bp）の、第5図はマイコプラズマ　アルギニニ（400 bp）の、第6図はマイコプラズマ　ブルモニス（513 bp）の、第7図はマイコプラズマ　ニューロリティカム（539 bp）の、第8図はマイコプラズマ　アルスリティディス（444 bp）の、第9図はマイコプラズマ　ハイオニューモニエ（731 bp）の、第10図及び第11図はマイコプラズマ　フェーメンタンス（522 bp）の、第12図及び第13図はマイコプラズマ　ホミニス（それぞれ406 bp、及び405 bp）の、第14図及び第15図はウレアプラズマ　ウレアリティカム（それぞれ517 bp、及び516 bp）のそれぞれのDNA配列を示している。

第1図～第15図のマイコプラズマDNA配列の相同性を検討し、これらのマイコプラズマ

に特有な共通配列を選定し、検出すればマイコプラズマ一般が検出できる。これらの配列の検出方法としては、遺伝子工学的検出方法を用いれば良いが、前述のPCR法が現在最も高感度な検出方法である。PCR法であらゆるマイコプラズマDNAを増幅するためのプライマーとしては、領域内でマイコプラズマすべてに関してアニーリングできるプライマーDNA対であれば良いし、そのようなプライマー対を複数用意して混合して使用してもよい。

プライマー対としては、例えば表2のプライマー対を、DNA合成機で合成し、HPLCで精製できる。

表2　マイコプラズマ一般を増幅させるためのプライマー

| | |
|----------------------------|-----------|
| 5' ACACCATGGGAGCTGGTAAT 3' | プライマー-2-1 |
| 5' GCATCCACCAAAAACTCT 3' | プライマー-2-2 |
| 5' GTTCTTTGAAAACTGAAT 3' | プライマー-3-1 |
| 5' GCATCCACCAAAAACTCT 3' | プライマー-3-2 |

PCR法としては使用プライマー対を選択し、次いで例えばアニーリング温度55℃、サイクル回数30回の条件でPCR反応を行えば良い。

増幅後のマイコプラズマDNAの検出は、例えばアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、スポット法、及びサザンブロット法を用いて行うことができる。スポット法、サザンブロット法の際は増幅領域内でプローブDNAを選択すれば良い。その一例としては、表3のプローブ1を、プライマー2-1、プライマー2-2を用いた場合のPCR増幅DNAの検出用プローブとして用いても良い（表3）。

表3

5' GTTCTTTGAAAACTGAAT 3'　　プローブ1

プローブDNAは前記プライマーDNAと同様の方法で合成、精製することができる。プローブDNAは、標識化することにより、高感度

な検出が可能となる。

標識化の方法は放射性同位元素標識法に限らず、酵素標識、蛍光標識、ビオチン、アビジン系標識、ケミプローブ標識法等公知の方法なら何でもよい。

実際選定されたプライマーを用い、各マイコプラズマDNAの特定領域をPCR反応で増幅することができ、電気泳動法、サザンハイブリダイゼーション法等により高感度に検出することができる。

一方、個々の各マイコプラズマDNAを特異的に増幅するためには、プライマー領域内で各マイコプラズマに特異的なDNA配列となるように、少なくとも一方のプライマーを選定すれば良い。その一例として、マイコプラズマ　ハイオニューモニエだけを特異的に増幅するプライマー対として、表4に示すようなものを選定できる。

表4 プタ肺炎マイコプラズマ ハイ
オニューモニエを増幅させるた
めのプライマー対

| | |
|----------------------------|-----------|
| 5' ACACCATGGGAGCTGGTAAT 3' | プライマー-4-1 |
| 5' ACCTGATTTTCAATCAGAA 3' | プライマー-4-2 |

このようにマイコプラズマ一般に共通なDNA配列、及び各マイコプラズマに特異的なDNA配列が明らかになることにより、試料中のマイコプラズマの検出、汚染マイコプラズマの同定、病原性マイコプラズマの検出等を高感度に行うことができる。

なお、表1に示したマイコプラズマ カプリコラムのDNA配列より選択したプライマー対は、他の11種のマイコプラズマDNAをPCR法で増幅することができるが、他のマイコプラズマのDNA配列と、配列が完全に一致しておらず、PCR反応において、37℃でのアニーリングが必要で、反応サイクルも50回行うことにより増幅できる。このため、他の細菌のDNA例えば大腸菌K-12株DNAや、枯草

のDNA及びその相補鎖を高感度に検出する方法はすべて本発明に含まれるものであり、例えばQβ-レプリケース アンプリフィケーション システム [バイオ/テクノロジー (Bio/technology)、第6巻、第1197頁 (1988年)] による方法が挙げられる。

〔実施例〕

以下本発明を実施例をもって詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

実施例1

マイコプラズマの16SrRNA-スベア-領域-23SrRNAをコードしているDNA領域の塩基配列決定

(1) マイコプラズマDNAの調製

培養細胞に高頻度で汚染するマイコプラズマとして、マイコプラズマ フェーメンタンスPG18株、マイコプラズマ ハイオリニスBT S7株、マイコプラズマ オーラレCH19299株、マイコプラズマ ホミニスPG21株、マイコ

プラズマ サリバリウムPG20株、マイコプラズマ アルギニニG230株、ウレアプラズマ ウレアリティカムT960株、マウス病原性マイコプラズマとして、マイコプラズマ ブルモニスm53株、マイコプラズマ アルスリティディスPG6株、マイコプラズマ ニューロリティカムPG28株、ブタ病原性マイコプラズマとして、マイコプラズマ ハイオニューモニエVPP11株、ヤギ病原性マイコプラズマとして、マイコプラズマ カプリコラムCALIP、KID株 (いずれも東大医学部附属動物実験施設より分与)を公知の改良したエドワード(Edward)培地32を用いて、37℃で培養し、10000g、1時間遠心して培地を除いた。TE緩衝液(10mMトリス(Tris)-HCl、pH 7.5、1mM EDTA)で菌体を洗浄後、ラジン(Razin)らの方法[インターナショナル ジャーナル オブ システムチック バクテリオロジー(Int. J. Syst. Bacteriol.)、第33巻、第201~206頁(1983)]で各マイコプラズマDNAを調製した。

一方、表2に示すプライマー対は、マイコプラズマに特有で、DNA配列も一致し、PCR反応において、55℃でのアニーリング、反応サイクル30回でマイコプラズマDNAを特異的に増幅し、上記細菌DNAの増幅は認められなかった。

PCR法の場合、マイコプラズマ感染細胞1個よりの検出が可能であり、マイコプラズマの早期検出が可能となり、汚染細胞、汚染動物等の管理が容易となる。

また、本発明に従って、マイコプラズマ特定DNA領域を増幅させるためのプライマー対をそろえてキットしておくことにより、マイコプラズマの検出を簡便に行うことができる。なお、キットに用いる試薬は溶液状でも良いし、凍結乾燥物でもよい。

以上PCR法を用いたマイコプラズマの高感度検出法について詳細に説明してきたが、本発明はPCR法に限定されるものではなく、特定

プラズマ サリバリウムPG20株、マイコプラズマ アルギニニG230株、ウレアプラズマ ウレアリティカムT960株、マウス病原性マイコプラズマとして、マイコプラズマ ブルモニスm53株、マイコプラズマ アルスリティディスPG6株、マイコプラズマ ニューロリティカムPG28株、ブタ病原性マイコプラズマとして、マイコプラズマ ハイオニューモニエVPP11株、ヤギ病原性マイコプラズマとして、マイコプラズマ カプリコラムCALIP、KID株 (いずれも東大医学部附属動物実験施設より分与)を公知の改良したエドワード(Edward)培地32を用いて、37℃で培養し、10000g、1時間遠心して培地を除いた。TE緩衝液(10mMトリス(Tris)-HCl、pH 7.5、1mM EDTA)で菌体を洗浄後、ラジン(Razin)らの方法[インターナショナル ジャーナル オブ システムチック バクテリオロジー(Int. J. Syst. Bacteriol.)、第33巻、第201~206頁(1983)]で各マイコプラズマDNAを調製した。

(2) 個々のマイコプラズマの16SrRNA-スペーサー領域-23SrRNAをコードしているDNA領域の塩基配列決定

マイコプラズマ カブリコラムの既知の16SrRNA及び23SrRNAをコードしているDNA配列より当該領域をPCR法で増幅するための一対のオリゴヌクレオチド 表1のプライマー1-1及びプライマー1-2を選定し、アプライドバイオシステムズ社のDNA合成機を用いて合成し、脱保護の後イオン交換HPLC (TSKゲル、DEAB-2SWカラム) で精製し、セブapak (SBP-PAK) C₁₈ (ウォーターズ社) で脱塩し、各DNAを約50μg得た。

実施例1-(1)で調製したマイコプラズマのDNA 50ngをそれぞれ0.5ml用チューブに取り、10μlの10×増幅用緩衝液、16μlの1.25mM dNTP混合液 (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、1μlの20μMプライマー1-1、1μlの20μMプライマー1-2、0.5μlの5ユニット/μlタック-ポリメラーゼを加

え、更に滅菌水を加えて100μlの溶液にした。

この反応液は上層に100μlのミネラルオイル (シグマ社) を加えた後、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラー (Thermal-Cycler) (宝酒造社販売) により増幅反応を行った。反応条件は、94℃、30秒間の変性→37℃、2分間のプライマーのアニーリング→72℃、2分間の合成反応のサイクルを50サイクル行った。

反応後、上層のミネラルオイルを除去した後、反応液の2μlを取り、1%アガロース (宝酒造社製) ゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色し、DNAの増幅を確認した。

その結果、ウレアプラズマ ウレアリティカムでは約550bpと150bpのバンドが検出され、他のマイコプラズマでは約450bpから700bpの単一のバンドが検出された。

次に反応液98μlを1.5ml容の別のエッペ

ンドルフチューブに移しTE (10mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH 8.0) 緩衝液で飽和したフェノールとクロロホルムの等量混合液で抽出した後、上層を別のエッペンドルフチューブに取り、10μlの3モル酢酸ナトリウム溶液、250μlのエタノールを加え、かくはんして、-80℃に15分間放置後、16000rpmで10分間遠心して上清を除去しDNA沈殿を回収した。次いで80%エタノール200μlを加え、16000rpmで3分間遠心後、上清を除去した後真空乾燥した (エタノール沈殿)。単一バンドが検出された11種のマイコプラズマDNAに関しては100μlのTE緩衝液に溶解し20%ポリエチレングリコール、2.5モル塩化ナトリウム溶液60μlを加えてかくはんして0℃に1時間放置後、16000rpmで10分間遠心して上清を除去した。得られたDNA沈殿を80%エタノールで洗浄し、真空乾燥した後100μlの水に溶かした。2種類のバンドが得られた。ウレアプラズマ ウレアリティカムに関して

は、エタノール沈殿したDNAを10μlのTE緩衝液に溶解し1%低融点アガロース (シーブラック アガロース (Sea Plaque Agarose)、宝酒造) ゲルで電気泳動後、約550bpの大きさのバンドを切出し、ジーン クリーン (GENE CLEAN) II キット [フナコシ薬品] を用いてDNAを100μlの水に抽出した。フェノールとクロロホルムの等量混合液で処理した後エタノール沈殿を行い、20μlの水に溶解した。このようにして得られたDNAを鋳型として次のように直接ジデオキシ法によるDNA配列決定を行った。PCRによるDNA増幅に用いたプライマー1-1、及びプライマー1-2をメガラベル (MBGALABEL) キット (宝酒造) を用いて5'末端を³²Pでラベルした。ラベルしたプライマー1-1、あるいはプライマー1-2を1pmol、鋳型DNAを約0.8pmol、×10緩衝液 (70mMトリス-HCl、pH 7.5、200mM塩化ナトリウム、70mM塩化マグネシウム、1mM EDTA) 1.5μlに水を加え14μlにした後、

94℃で3分間加熱し水中で急冷した。1μlのクレノウ(2ユニット)(宝酒造)を加えて混合後3μlを4種類のdNTP-ddNTPの混合液2μlが入った4本のチューブに分注し混合した。

4種類のdNTP-ddNTPの混合液の組成は次のようである。(G) 83μM dATP、dTTP、4.2μM dc³GTP(7-deaza2' dGTP)、2.5μM dCTP、58μM ddGTP、(A) 83μM dc³GTP、dTTP、2.5μM dCTP、4.2μM dATP、100μM ddATP、(T) 83μM dc³GTP、dATP、2.5μM dCTP、4.2μM dTTP、200μM ddTTP、(C) 83μM dc³GTP、dATP、dTTP、2.5μM dCTP、50μM ddCTP。

混合した反応液を42℃で20分間保持し、チェイス混合液(1mM、dGTP、dATP、dTTP、dCTP)1μlを加え更に20分間保持した後、4μlの反応停止液(95%ホルムアミド、20mM BDTA、0.05%プロモフェノールブルー、0.05%キシレンシアノールFF)を加えた。

を制限酵素HincIIで切断したDNA断片100ngをDNAライゲーションキット(宝酒造)を用いてライゲーションを行った。反応液をコーエン(Cohen)らの方法により大腸菌JM109の形質転換に用い、形質転換菌をJ.ビエイラ(J. Vieira)らの方法で選別した。3種のマイコプラズマに関して得られた白コロニーを12個ずつ選び0.5ml用チューブに50μlの滅菌水で懸濁し、5分間加熱処理した後、ジーンアンブ™キット(Gene Amp™ Kit)(宝酒造社販売)に含まれている10μlの10×増幅用緩衝液(100mMトリス-HCl、pH 8.3、500mM KCl、15mM MgCl₂、0.1%(W/V)ゼラチン)、16μlの1.25mM dNTP混合液(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、1μlの1.0μMのM13プライマーM4(宝酒造社製)、1μlの10mM M13プライマーRV(宝酒造社製)、0.5μlの5ユニット/μlタックターポリメラーゼを加え、更に滅菌水を加えて100μlの溶液にした。

94℃で3分間加熱後、氷上で急冷した後、変性ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、オートラジオグラフィー後、ラダーを読み取りDNA配列決定を行った。

マイコプラズマ ハイオリニス、マイコプラズマ オーラレ、マイコプラズマ サリバリウム、マイコプラズマ アルギニニ、マイコプラズマ ブルモニス、マイコプラズマ アルスリティディス、マイコプラズマ ニューロリティカム、マイコプラズマ ハイオニューモニエの各DNA配列は第2図～第9図に示すとおりである。

一方、マイコプラズマ フェーメンタンス、マイコプラズマ ホミニス、ウレアプラズマ ウレアリティカムに関して2個のラダーが連続して生じる個所があった。これらのマイコプラズマに関しては、PCRで増幅したDNA断片約250ngをDNAブランチングキット(Blunting kit)(宝酒造)を用いて末端を平滑化した。平滑化したDNA断片50ngとpUC18

この反応液は上層に100μlのミネラルオイルを加えた後、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラーにより増幅反応を行った。反応条件は、94℃、1分間の変性→55℃、2分間のプライマーのアニーリング→72℃、2分間の合成反応のサイクルを25サイクル行った。

反応後、上層のミネラルオイルを除去した後、反応液の10μlを取り、1%アガロース(宝酒造社製)ゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色し、増幅されたDNAの長さを確認し、3種類のマイコプラズマに関して増幅されたDNAを3クローンずつプライマー1-1、プライマー1-2を用いて同様に直接DNA配列決定を行った。その結果、3種類のマイコプラズマに関して2種類ずつのDNA配列を得た。その配列は第10図～第15図に示すとおりである。

実施例2

マイコプラズマDNAのPCRによる増幅

(1) オリゴヌクレオチドプライマーDNAの合

成及び精製

図面に示したマイコプラズマDNAの共通配列を増幅するために選択した表2に示した2対のプライマー-DNA対をアプライドバイオシステムズのDNA合成機を用いて合成し、脱保護の後、イオン交換HPLC(TSKゲル、DBAE-2SWカラム)で精製し、セブパックC₁₈(ウォーターズ社)で脱塩し、各DNAを約50ng得た。

(2) マイコプラズマ共通配列DNAのPCRによる増幅

実施例1-(1)で調製した12種類の各マイコプラズマDNA 5ng、及び対照とするため調製したマウスDNA 5ng、大腸菌K-12株DNA 5ng、枯草菌ISW 1214株DNA 5ngを鋳型DNAとして、それぞれ0.5ml容エッペンドルフチューブに2本ずつとり、10μlの10×増幅用緩衝液、16μlの1.25mM dNTP混合液(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)を加え、各鋳型DNAの一方のチューブに1μlの20μMプライマー2-1、1μlの20μMプライマ

ー2-2、もう一方のチューブに1μlの20μMプライマー3-1と1μlの20μMプライマー3-2を加え、0.5μlの5ユニット/μlタック-ポリメラーゼを加え、更に滅菌水を加えて100μlの溶液にした。

この反応液は上層に100μlのミネラルオイルを加えた後、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラーにより増幅反応を行った。反応条件は、94℃、30秒間の変性→55℃、2分間のプライマーのアニーリング→72℃、1分間の合成反応のサイクルを30サイクル行った。

反応後、上層のミネラルオイルを除去した後、反応液の5μlを取り、1%アガロース(宝酒造社製)ゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色し、DNAの増幅を確認した。

その結果、いずれのプライマー対を用いた場合でも各マイコプラズマについて、それぞれのDNA配列より予想される長さのバンドが検出された。しかし、マウスDNA、大腸菌K-12

DNA、枯草菌ISW 1214株DNAを鋳型とした場合には、バンドは検出されず、各プライマー対は、マイコプラズマrRNAをコードするDNAに特異的であった。

実施例3

ブタ肺炎マイコプラズマ ハイオニューモニエDNAのPCRによる増幅

(1) オリゴヌクレオチド プライマーDNAの合成及び精製

マイコプラズマ ハイオニューモニエのrRNAをコードするDNA配列より選定した、該マイコプラズマに特異的なDNA配列を増幅するための表3に示したプライマー対を実施例2-(1)と同様に合成、精製し、それぞれ約50ngのDNAを得た。

(2) マイコプラズマ ハイオニューモニエDNAのPCRによる増幅

鋳型DNAとして実施例1-(1)で調製した各マイコプラズマDNA 5ng及び前述のマウスDNA 5ng、大腸菌DNA 5ng、枯草菌DNA 5

ng、プライマー対として上記3-(1)で得たプライマーを用い実施例2-(2)と同様にPCR反応を行い、DNAの増幅及び検出を行った。その結果、マイコプラズマ ハイオニューモニエのDNAについてのみそのDNA配列より予想された長さのバンドが検出され、他のマイコプラズマDNA、マウスDNA、大腸菌DNA、枯草菌DNAを鋳型とした場合にはバンドは検出されず、このプライマー対はマイコプラズマハイオニューモニエを特異的に増幅した。

実施例4

サザンハイブリダイゼーションによるマイコプラズマDNAの検出

(1) マイコプラズマDNAの検出

実施例2-(2)でプライマー対として、プライマー2-1、プライマー2-2を用いてPCR反応を行った反応溶液2μlを1%アガロースゲルに電気泳動し、アルカリ変性後、ナイロンメンブラン〔アマーシャム ハイボンド-N (Amersham Hybond-N)〕に一晚サザンブロット

した。紫外線トランスイルミネーター (254 nm) に10分間照射させ、DNAをメンブランに固定させた。

このメンブランは、プレハイブリダイゼーション緩衝液 (5×デンハーツ液、5×SSC、0.1% SDS、100 μg/ml サケ精子DNA) 5 ml 中で50℃、2時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、プローブとして、実施例2-(1)で合成したプライマー3-1を用い、該プローブを³²Pにてラベルしたものを加え1晩ハイブリダイゼーションを行った。

プローブの³²P-ラベルはメガラベルキット (宝酒造) を用いて次のように行った。10 pmolのプローブ、1 μl の10×リン酸化緩衝液、50 μCi の[γ-³²P] ATP (アマージャム社)、10ユニットのT4-ポリヌクレオチドキナーゼを含む反応液に滅菌水を加えて10 μl にし、37℃、30分間反応させた。反応後、94℃、5分間処理し、この反応液の全量 (約10⁶ cpm) をハイブリダイゼーション

に用いた。

ハイブリダイゼーション後、メンブランを2×SSC、0.1% SDSを含む洗浄液1で室温10分間で4回洗浄し、続いて1×SSC、0.1% SDSを含む洗浄液2で55℃、50分間で2回洗浄した。メンブランは乾燥させた後、X線フィルム (富士フィルム) を入れたカセット内で-70℃、一晚感光させ、オートラジオグラフをとった。

この結果、12種類のマイコプラズマDNAの増幅物についてはすべてバンドが検出されたが、マウスDNA、大腸菌DNA、枯草菌DNAを鋳型とした反応溶液ではバンドは認められなかった。

実施例5

マイコプラズマDNAの増幅・検出キットの作成

試料中のマイコプラズマDNAを増幅・検出するためのキットを作成した。

マイコプラズマ共通配列増幅・検出キット

共通配列DNA増幅用プライマーとして、表2のプライマー2-1及びプライマー2-2が各20 μM 溶液となるようにTE緩衝液20 μl に溶解し、マイコプラズマプライマー液 (A剤) とした。また表2のプライマー3-1及び3-2が各20 μM 溶液となるようにTE緩衝液20 μl に溶解し、マイコプラズマプライマー液 (B剤) とした。

A剤を選択し、マイコプラズマDNAを増幅する場合のDNA検出用プローブとして、表3のプローブ1の2 μg をTE緩衝液20 μl に溶解し、マイコプラズマプローブ液 (C剤) とした。

A剤、B剤、及びA剤とC剤の組合せでキットI~IIIを作成した (表5)。

表 5

| | | | |
|--------|----|---------------|------------------------|
| キットI | A剤 | マイコプラズマプライマー液 | 20 μl (1 μl × 20回分) |
| キットII | B剤 | " | (20 μl ") |
| キットIII | A剤 | " | (20 μl ") |
| | C剤 | マイコプラズマプローブ液 | (20 μl ") |

マイコプラズマハイオニューモニエDNA増幅・検出用キット

マイコプラズマハイオニューモニエDNA増幅用プライマーとして、表4のプライマー4-1、及び4-2が各20 μM 溶液となるようにTE緩衝液20 μl に溶解し、マイコプラズマプライマー液 (D剤) としキットIVを作成した (表6)。

表 6

| | | | |
|-------|----|---------------|------------------------|
| キットIV | D剤 | マイコプラズマプライマー液 | 20 μl (1 μl × 20回分) |
|-------|----|---------------|------------------------|

第 12 図

5' GAATAGTCTCGGGTCTTGTACACACCCCGCTCAGCCATCGGAGCTGCTAATACCCAAAGTCGGTTTGTACCTCG
 90 100 110 120 130 140 150 160
 GAGCGACCGCTAGGTAGGAGTGTGCTGGGTGAGTGTACAGGTATCCCTACGAGACGTGGGATGGAACA
 170 180 190 200 210 220 230 240
 CCTCTTCTACGGAGTACAGCTACGTTATGGAAAAATATTTGTATCCAGTTTTCGAGAGATTATCTCTCGGTCT
 250 260 270 280 290 300 310 320
 TTGAAACTCAATACGACATTGATATTAATTAATTTTCGAAGTTTAGATCAACCATAGAAATATTTATTTATAA
 330 340 350 360 370 380 390 400
 GACAACAATAGCTCATACATTACAAACTATTAAACAGCAAGAGTTTGTGGTGCCTGGCTGCAAGTGGCA
 AGAGC 3'

第 13 図

5' GAATAGTCTCGGGTCTTGTACACACCCCGCTCAGCCATCGGAGCTGCTAATACCCAAAGTCGGTTTGTACCTCG
 90 100 110 120 130 140 150 160
 GAGCGACCGCTAGGTAGGAGTGTGCTGGGTGAGTGTACAGGTATCCCTACGAGACGTGGGATGGAACA
 170 180 190 200 210 220 230 240
 CCTCTTCTACGGAGTACAGCTACGTTATGGAAAAATATTTGTATCCAGTTTTCGAGAGATTATCTCTCGGTCT
 250 260 270 280 290 300 310 320
 TTGAAACTCAATACGACATTGATATTAATTAATTTTCGAAGTTTAGATCAACCATAGAAATATTTATTTATAA
 330 340 350 360 370 380 390 400
 GACAACAATAGCTCATACATTACAAACTATTAAACAGCAAGAGTTTGTGGTGCCTGGCTGCAAGTGGCA
 AGAGC 3'

第 14 図

5' GNTAGTCTCGGGTCTTGTACACACCCCGCTCAGCCATCGGAGCTGCTAATACCCAAAGTCGGTTTGTACCTCG
 90 100 110 120 130 140 150 160
 TCGAGCATGCTCTAGGTAGGAGTGTGCTGGGTGAGTGTACAGGTATCCCTACGAGACGTGGGATGGAACA
 170 180 190 200 210 220 230 240
 CACCTCGTCTTCTCGGAGTAAATTTTAAATAGTACTAATAGTGTACATTTTATAAATCCATGTGAATATGAC
 250 260 270 280 290 300 310 320
 CACTTTTTTAAATAATTTCAAAAGTTTCATGCTCGGACTCTATTAGTTTGAGAGTTTATGCTCCCATATAT
 330 340 350 360 370 380 390 400
 TTATATATGATGATCGATCTTTGAAAGTGAATTAATATCAACAATCTTCTAATCATGNTATTAGTTGTCA
 410 420 430 440 450 460 470 480
 GTCACAGAACTATATTAATATAGTTAACTATACCAACACCTTAAAGGATTATTAATAGTTACTAAGAG
 CTTATGATGCTTGGCAACAGCGGATGAAG 3'

第 15 図

5' GNTAGTCTCGGGTCTTGTACACACCCCGCTCAGCCATCGGAGCTGCTAATACCCAAAGTCGGTTTGTACCTCG
 90 100 110 120 130 140 150 160
 TCGAGCATGCTCTAGGTAGGAGTGTGCTGGGTGAGTGTACAGGTATCCCTACGAGACGTGGGATGGAACA
 170 180 190 200 210 220 230 240
 CACCTCGTCTTCTCGGAGTAAATTTTAAATAGTACTAATAGTGTACATTTTATAAATCCATGTGAATATGAC
 250 260 270 280 290 300 310 320
 CACTTTTTTAAATAATTTCAAAAGTTTCATGCTCGGACTCTATTAGTTTGAGAGTTTATGCTCCCATATAT
 330 340 350 360 370 380 390 400
 TTATATATGATGATCGATCTTTGAAAGTGAATTAATATCAACAATCTTCTAATCATGNTATTAGTTGTCA
 410 420 430 440 450 460 470 480
 TCGACAGAACTATATTAATATAGTTAACTATACCAACACCTTAAAGGATTATTAATAGTTACTAAGAG
 TTATGATGCTTGGCAACAGCGGATGAAG 3'

第 9 図

5' ACTGNGTNGGNNHTGTACACACCCCGCTCAGCCATCGGAGCTGCTAATACCCAAAGTCGGTTTGTACCTCG
 10 20 30 40 50 60 70 80
 90 100 110 120 130 140 150 160
 ACCATTCCCTACGCGAGCGAGTGTGCTGGGTGAGTGTACAGGTATCCCTACGAGACGTGGGATGGAACA
 170 180 190 200 210 220 230 240
 CCTCTCTAGCAAAANNNNAACAACATAAATTTATCCACCTTTTATAGATTAATTTTCTAAATTTTACAT
 250 260 270 280 290 300 310 320
 TTTAACACATTTTCATTAATTTATCTCTTTTATTAATTAAGATTTTATAGATTTTATTTGATTTT
 330 340 350 360 370 380 390 400
 AATGATTTCTCTCTTTATTAATTAATTTATTAATCTAGTTGTAATTTAAATTTGGAGTATATACCTAGTT
 410 420 430 440 450 460 470 480
 TGGCTATATACCTAGTTTGAAGGCTTAAAGCTCTCAAAACAAAAAATTCGCAAGCGCAACAGCTCTTTCAAAA
 490 500 510 520 530 540 550 560
 CTGAATAGCAATTTTATCTGATTGAAMATCAGTATATCTTAATGATCTTTAAAAATTAACCGCATTTATTT
 570 580 590 600 610 620 630 640
 TTGCTTTTAAATTTTGAATTTAAAAATTAAMACAAAGATTATGCTAAATTTGTTAAATACCTTAAGATATATTAT
 650 660 670 680 690 700 710 720
 CTCAAATAGGCTATACCAAAATAGTTTAACTTTTAAATAATAGAGTATTTGGTGCATGCGNNNNNNNTATA
 730
 CCGAATGAGCT 3'

第 10 図

5' GNTAGTCTCGGGTCTTGTACACACCCCGCTCAGCCATCGGAGCTGCTAATACCCAAAGTCGGTTTGTACCTCG
 10 20 30 40 50 60 70 80
 90 100 110 120 130 140 150 160
 GTCCTAAGCGAGCGTGTGCTGCTGGGTGAGTGTACAGGTATCCCTACGAGACGTGGGATGGAACA
 170 180 190 200 210 220 230 240
 TCTACGGAGTACAAAGAGTACTTTTAAAGTACTAATCTATTTCTACTAGACCTATTTTATATATTTTGT
 250 260 270 280 290 300 310 320
 ATGTGCTTTTATGGGCTAAGCTTTATATCTAGTTTGAGAGCAATATTTTCTCTCATTTTGTCTTGA
 330 340 350 360 370 380 390 400
 ACTGAATAGTAAATTTTGGATTTTAAACGACATCAAAATTAATTAATGTTTGTGTTGTTTCTCATCGAA
 410 420 430 440 450 460 470 480
 AATCATATTAATATGATTCATTGAAATGTTTAAATACATCATACAACTATACAAATAGGAAATACTTTAA
 490 500 510 520
 TAAGGAAGATTTGTGCTGCTGCGTGGNNNNNAGTGA 3'

第 11 図

5' GNTAGTCTCGGGTCTTGTACACACCCCGCTCAGCCATCGGAGCTGCTAATACCCAAAGTCGGTTTGTACCTCG
 10 20 30 40 50 60 70 80
 90 100 110 120 130 140 150 160
 GTCCTAAGCGAGCGTGTGCTGCTGGGTGAGTGTACAGGTATCCCTACGAGACGTGGGATGGAACA
 170 180 190 200 210 220 230 240
 TCTACGGAGTACAAAGAGTACTTTTAAAGTACTAATCTATTTCTACTAGACCTATTTTATATATTTTGT
 250 260 270 280 290 300 310 320
 TATGTGCTTTTATGGGCTAAGCTTTATATCTAGTTTGAGAGCAATATTTTCTCTCATTTTGTCTTGA
 330 340 350 360 370 380 390 400
 ACTGAATAGTAAATTTTGGATTTTAAACGACATCAAAATTAATTAATGTTTGTGTTGTTTCTCATCGAA
 410 420 430 440 450 460 470 480
 AATCATATTAATATGATTCATTGAAATGTTTAAATACATCATACAACTATACAAATAGGAAATACTTTAA
 490 500 510 520
 TAAGGAAGATTTGTGCTGCTGCGTGGNNNNNAGTGA 3'

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

C 12 Q 1/04
G 01 N 33/50
33/53
33/569

//(C 12 Q 1/04
C 12 R 1:00)

識別記号

庁内整理番号

P 6807-4B
M 7055-2J
Z 7906-2J
9015-2J